

**GENERATIONSZEITZYKLUS VON
TRANSFORMATIONSSTADIEN WÄHREND DER
ENTWICKLUNG N-BUTYL-N-(4-HYDROXYBUTYL)-
NITROS-AMIN-INDUZierter
HARNBLASENCARCINOME DER RATTE**

Norbert Fischer

1975



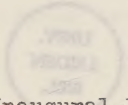
Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551905_0084

Aus dem Pathologischen Institut der Universität München

Direktor: Prof. Dr. M. Eder

GENERATIONSZEITZYKLUS VON TRANSFORMATIONSSTADIEN WÄH-
REND DER ENTWICKLUNG N-BUTYL-N-(4-HYDROXYBUTYL)-NITROS-
AMIN-INDUZierter HARNBLASENCARCINOME DER RATTE



Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Norbert Fischer

aus

Ulm/Donau

Jahr

1975

Berichterstatter: Prof. Dr. A. Schauer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Eder

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen

Prüfung: 24. Juni 1975



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. MATERIAL UND METHODIK	3 - 7
1. Versuchsanordnung	3
2. Auswertung	5
a. Bestimmung des Mitoseindex	
b. Bestimmung des ^3H -TdR-Index	
c. Bestimmung des Anteils DNS-syn- thetisierender Zellen an der Ge- samtpopulation nach intermittie- render ^3H -Thymidin-Dauermarkie- rung	
d. Bestimmung des Generationszeitzyk- lus	
III. ERGEBNISSE	7 - 16
1. Morphologische Befunde	7
2. Autoradiographische Befunde	12
a. ^3H -TdR-Index in atypischen Urothelbezirken und Carcino- mata in situ nach 1-stündiger radioaktiver Versuchszeit	

- b. Anteil DNS-synthetisierender Zellen nach intermittierender ³H-Thymidin-Dauermarkierung in Atypien und Carcinomata in situ

- c. Generationszeitzyklus in Aty-
prien und Carcinomata in situ

IV.	BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE	17 - 22
V.	ZUSAMMENFASSUNG	23
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	25 - 30

I. EINLEITUNG

Harnblasencarcinome können erfahrungsgemäß über die maligne Entartung zunächst gutartig erscheinender Papillome entstehen oder aber sich direkt aus einem Carcinoma in situ der Harnblasenschleimhaut, dem sogenannten intraurothelialen Carcinom, entwickeln. Auf die Entstehungsmöglichkeit von Transitionalzellcarcinomen aus Papillomen machten beim Menschen bereits Zuckerkindl (1910), Stenius (1922) und Christeller (1925) aufmerksam. Melicow und Mitarbeiter beschrieben erstmals die Entstehung von Harnblasencarcinomen aus einem intraurothelialen Carcinom (Melicow 1952; Melicow und Hollowell 1952). Lange Zeit war jedoch unklar, welchem der beiden Entstehungswege die größere Bedeutung während der Harnblasencarcinogenese zukommt. Neuere systematische tierexperimentelle Untersuchungen ergaben, daß sich Transitionalzellcarcinome der Harnblase vorwiegend durch maligne Entartung von Papillomen entwickeln (Kunze und Schauer 1972; Schauer, Kunze und Schatt 1973; Kunze, Schauer und Schatt 1974). Das Tierexperiment führte dabei zu der Erkenntnis, daß der Übergang in ein bösartiges Wachstum nicht plötzlich, sondern stufenweise progredient über verschiedene, hintereinandergeschaltete Transformationsstadien erfolgte. Als erstes morphologisch nachweisbares Stadium konnten herdförmig, scharf umschriebene atypische Urothelbezirke nachgewiesen werden. Aus diesen atypischen Zellherden entwickelten sich in einem weiteren Transformationsstadium mit erheblicher Steigerung des Malignitätsgrades Carcinomata

in situ, die schließlich in ein fokal invasives Wachstum übergangen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, nähere Aufschlüsse über die Proliferationskinetik der einzelnen Transformationsstadien während der Entwicklung von N-Butyl-N-(4-Hydroxybutyl)-Nitrosamin-induzierten Transitionalzellcarcinomen zu erhalten. Dabei interessierte vor allem die Frage, ob sich die histologisch und zytologisch gut voneinander abgrenzbaren Stadien auch in ihrem Wachstumsverhalten unterscheiden. Zur Klärung dieses Problems wurden morphologische und autoradiographische Untersuchungen mit Bestimmung des ^3H -Thymidin-Markierungsindex, des Generationszeitzyklus und des Anteils proliferierender Zellen an der Gesamtpopulation nach intermittierender Dauermarkierung in atypischen Urothelbezirken und Carcinomata in situ durchgeführt.

II. MATERIAL UND METHODIK

1. Versuchsanordnung

140 weiblichen Wistar-Ratten (Inzuchtstamm des Pathologischen Instituts der Universität München; Ausgangsgewicht zwischen 180g - 200g) wurde N-Butyl-N-(4-Hydroxybutyl)-Nitrosamin (BBNA; Chemische Fabrik Schuchardt, München) in einer Dosierung von 20 mg/kg/die im Trinkwasser verabreicht. Die Expositionszeit betrug 80 Tage, die Induktionszeit (Gesamtversuchsdauer) 250 Tage. Die Tiere erhielten Altromin-Standardkost und Wasser ad libitum.

Der ^3H -Thymidin-Markierungsindex (^3H -TdR-Index) in atypischen Urothelbezirken und in Carcinomata in situ wurde bei insgesamt 13 Tieren bestimmt. Ihnen wurde 1 Stunde vor der Tötung 0.1 mCi/100g Körpergewicht ^3H -Thymidin (The Radiochemical Centre, Amersham, England; spezifische Aktivität 5.0 mCi/mMol) intraperitoneal verabreicht.

Bei insgesamt 16 Tieren wurde der Anteil proliferierender Zellen an der Gesamtpopulation in Atypien und Carcinomata in situ nach intermittierender Dauermarkierung bestimmt. Dabei wurde den Ratten alle 6 Stunden über einen Gesamtzeitraum von 49 Stunden hinweg ^3H -Thymidin (The Radiochemical Centre, Amersham, England; spezifische Aktivität 5.0 mCi/mMol) in einer Dosierung von 0.1 mCi/100g KG intraperitoneal inji-

ziert. 1 Stunde nach der letzten Injektion wurden die Tiere getötet.

Der Generationszeitzyklus wurde nach der Prozent-markierten-Mitosen-Methode (Quastler und Sherman) bestimmt. Diese Methode erlaubt es, die Generationszeit und ihre Teilphasen sowohl bei exponentiellem als auch bei einem "steady-state"-Wachstum direkt aus dem Prozentsatz markierter Mitosen als Funktion der Zeit nach einmaliger Markierung mit tritiiertem Thymidin abzulesen. Insgesamt erhielten dabei 57 Ratten ^3H -Thymidin (The Radiochemical Centre, Amersham, England; spezifische Aktivität 5.0 mCi/mMol) in einer Dosierung von 0.1 mCi/ 100 g KG intraperitoneal verabreicht. Die Anzahl der ursprünglich für den Versuch angesetzten Ratten war erheblich größer, doch konnten die Bestimmungen bei einem großen Teil der Tiere nicht vorgenommen werden, da diese keine entsprechenden Veränderungen des Harnblasenurothels aufwiesen. Die radioaktive Versuchszeit lag zwischen 1 Stunde und 30 Stunden, wobei stündlich mehrere Tiere getötet wurden.

Alle Versuchstiere wurden im Ätherrausch durch Dekapitation getötet. Von jeder Harnblase wurden nach 24-stündiger Fixierung in 10%-igem Formol und nach Einbettung in Paraplast 60 - 80 Serien- bzw. Stufenschnitte von 5 μ Dicke hergestellt, von denen in der Mehrzahl Autoradiogramme angefertigt wurden. Dazu wurden die ungefärbten histologischen Schnitte mit Stripping-Film Kodak AR 10 überzogen. Die photographische Expositionszeit betrug 14 Tage. Danach wurden die Autoradiogramme entwickelt und fixiert (Dau-

er der Entwicklung: 12 Minuten; Zusammensetzung der Entwicklerlösung: 7.2 g Natriumsulfit, 3.2 ml 10% Kaliumbromid, 1.8 g Amidol, 400 ml Aqua bidest.

Dauer der Fixierung: 25 - 30 Minuten; Zusammensetzung des Fixierbades: 150 g Natriumthiosulfat, 10 g Kaliummetabisulfit, 500 ml Aqua bidest.).

Anschließend wurden die Schnitte in der Dunkelkammer 30 Minuten fließend gewässert und mit Hämalaun (nach Mayer) gefärbt.

2. Auswertung

a. Bestimmung des Mitoseindex (%):

Der Mitoseindex (%) wurde in atypischen Urothelbezirken bei 7, in Carcinomata in situ bei 6 Tieren bestimmt. Dabei wurden pro Tier an mehreren Schnitten zwischen 1500 und 2000 Zellen ausgezählt. Ausgewertet wurden ausschließlich Mitosen im Stadium der späten Prophase bis zur Telophase.

b. Bestimmung des ^3H -TdR-Index (%):

Der ^3H -Thymidin-Markierungsindex (^3H -TdR-Index in Prozent) wurde in Atypien bei 7 Tieren, in Carcinomata in situ bei 6 Ratten bestimmt. Dabei wurden pro Tier durchschnittlich 5000 Zellen an verschiedenen, aufeinanderfolgenden Schnitten im gesamten Bereich einer Atypie oder eines Carcinoma in situ ausgezählt.

- c. Bestimmung des Anteils DNS-synthetisierender Zellen nach ^3H -Thymidin-Dauermarkierung (%):
Der Anteil proliferierender Zellen innerhalb atypischer Zellbezirke und Carcinomata in situ wurde jeweils bei 8 Tieren nach 49-stündiger intermittierender Dauermarkierung festgestellt. Dabei wurden im einzelnen an mehreren Stufenschnitten durchschnittlich 5000 Zellen im gesamten Bereich des veränderten Urothels ausgezählt.
- d. Bestimmung des Generationszeitzyklus:
Bei der Ermittlung der Generationszeit und ihrer Teilphasen wurde in Atypien und Carcinomata in situ das Verhältnis ^3H -Thymidin-markierter Mitosen zu nichtmarkierten Mitosen nach unterschiedlich langer radioaktiver Versuchszeit festgestellt. Dabei wurden mindestens 100 Mitosen der späten Prophase bis zur frühen Telophase berücksichtigt. Als markiert wurden Mitosen betrachtet, über denen wenigstens 5 Silberkörner nachweisbar waren. Aus dem Verlauf der Prozent-markierten-Mitosenkurve wurden folgende Zyklusphasen bestimmt:

Mittlere Generationszeit (T_G): Zeitlicher Abstand der beiden Markierungsgipfel

Mittlere DNS-Synthesezeit (T_S): Zeitlicher Abstand der Schnittpunkte des auf- und absteigenden Schenkels der Kurve bei einem Markierungsindex von 50 %

Mittlere postsynthetisch-prämitotische Phase und Mitosedauer ($T_{G2} + T_M$): Zeitlicher Abstand zwischen Zeitpunkt der Injektion und Erreichen eines 50%-igen Markierungsniveaus

Die mittlere postmitotische-präsynthetische Phase (T_{G_1}): Durch Subtraktion der Summe von G_2 , T_M und T_S von T_C

Die Dauer der Mitosephase wurde durch Anwendung nachstehender Formel ermittelt:

$$T_M = \frac{T_S \cdot \text{Mitose-Index}}{^3\text{H-TdR-Index}}$$

III. ERGEBNISSE

1. Morphologische Befunde

Die morphologischen Merkmale der atypischen Urothelzellen bestanden in einer Vergrößerung der Zellkerne mit Ausbildung unregelmäßiger Chromatinstrukturen, prominenter Nukleolen und einer unterschiedlich stark ausgeprägten zytoplasmatischen Basophilie.
(Abb. 1 und 2)

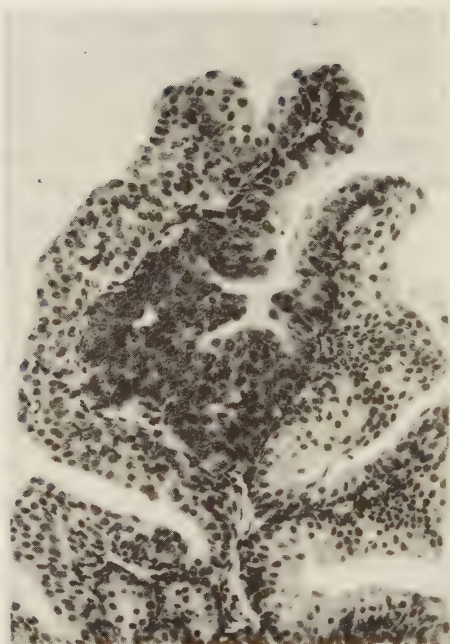


Abb.1: Fokale Atypie innerhalb eines kleinen Papilloms. Übergang von gutartig erscheinendem in atypisches Urothel mit starker Basophilie des Zytoplasmas und Vergrößerung der Nukleolen
Vergrößerung: 190-fach Hämalaun

Die atypischen Herde waren gegenüber den umgebenden, morphologisch gutartig erscheinenden Urothelstrukturen gut abgrenzbar. Gelegentlich konnte ein Übergang in atypisches Urothel an derselben papillären Struktur festgestellt werden (Abb. 2).

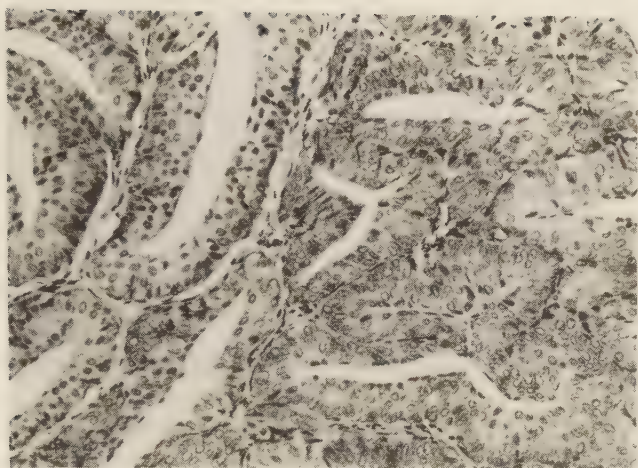


Abb.2: Atypische Zellverbände mit geringgradiger zytoplasmatischer Basophilie und bläschenförmigen Kernen (rechts) neben gutartig erscheinenden Urothelstrukturen (links)

Vergrößerung: 190-fach

Die Atypien ließen sich sowohl im Inneren als auch an der Oberfläche eines Papilloms nachweisen. Meistens traten die Atypien unizentrisch auf; in größeren Papillomen waren jedoch nicht selten auch mehrere atypische Herde an verschiedenen Stellen zu finden. Innerhalb der atypischen Urothelbezirke war häufig eine Plattenepithelmetaplasie mit unterschiedlich starker Verhornung zu beobachten. Bei oberflächlich gelegenen Verhornungsbezirken fanden sich des öfteren abgeschilfer-te Zellverbände im Harnblasenlumen. Der Mitoseindex betrug in den atypischen Foci durchschnittlich 0.27%, wobei die Extremwerte zwischen 0.15% ($\pm$ 0.18) und 0.4% ($\pm$ 0.2) lagen (Abb. 3).

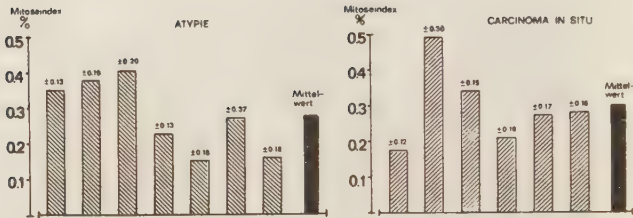


Abb.3: Mitose-Index (%) in atypischen Urothelbezirken (schraffierte Säulen; n=7) sowie Carcinomata in situ (schraffierte Säulen; n=6) mit Angabe der jeweiligen Standardabweichung und des Mittelwerts (schwarze Kolumnen). Kein signifikanter Unterschied der Mitose-Indices von Atypien und Carcinomata in situ ($p > 0.05$; Student-Test)

Die Carcinomata in situ waren cytologisch durch eine hochgradige Zellatypie und histologisch durch ein plum-
pes Vorwachsen der Zellverbände gegen die umgebenden,
gutartig erscheinenden urothelialen Strukturen gekenn-
zeichnet, ohne daß definitionsgemäß ein invasives
Wachstum vorlag (Abb. 4 und 5). Die Zellkerne waren
stark hyperchromatisch, unregelmäßig geformt und wie-
sen stark vergrößerte, zum Teil bizarre Nukleolen auf.
Der Mitoseindex betrug durchschnittlich 0.29%. Die Ex-
tremwerte lagen zwischen 0.18% (± 0.12) und 0.49% (± 0.3)
(Abb. 3).

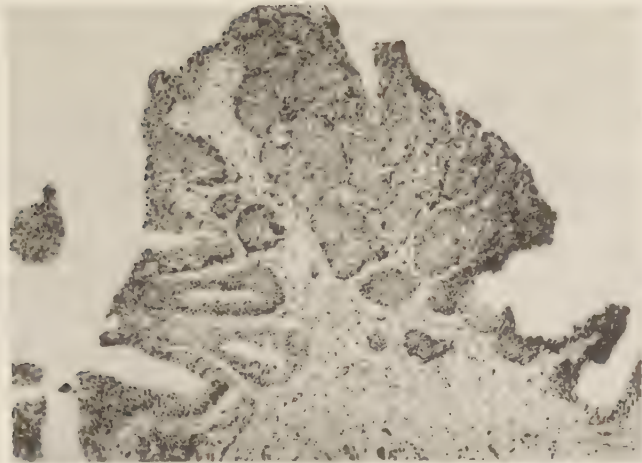


Abb.4: Papillom mit einem Carcinoma in situ (oben rechts)

Vergrößerung: 75-fach

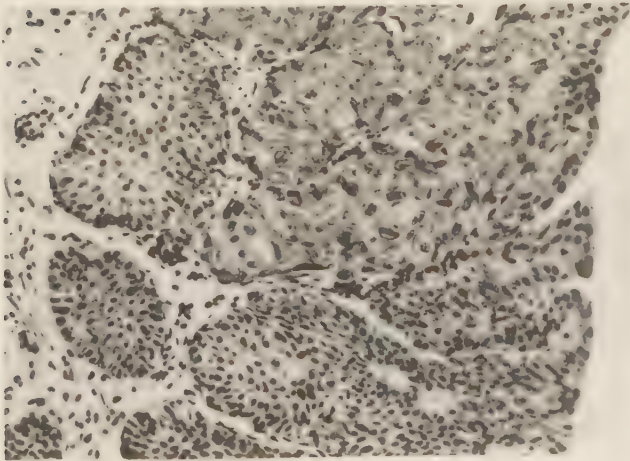


Abb.5: Ausschnittsvergrößerung von Abb.4. Hochgradige Zellatypie im Bereich des Carcinoma in situ (rechts oben) mit Polymorphie und Hyperchromasie der Zellkerne und plumpes Vorwachsen der Zellverbände gegen das Stroma

Vergrößerung: 190-fach

2. Autoradiographische Befunde

a. ^3H -TdR-Index nach 1-stündiger radioaktiver Versuchszeit:

In atypischen Urothelbezirken betrug der ^3H -TdR-Index im Durchschnitt 5.46%. Die Extremwerte lagen zwischen 1.4% (± 2.2) und 7.9% (± 2.9). Entsprechend der starken Markierungsunterschiede innerhalb der atypischen Herde waren die Schwankungsbreiten um den Mittelwert zum Teil relativ groß. In Carcinomata in situ wurde ein mittlerer Markierungsindex von 10.32% ermittelt, wobei die Extremwerte zwischen 7.8% (± 3.0) und 13.0% (± 4.1) lagen. Der Unterschied zwischen dem mittleren ^3H -TdR-Index in Atypien und Carcinomata in situ war dabei hochsignifikant ($p < 0.001$; Student-Test). (siehe Abb. 6)

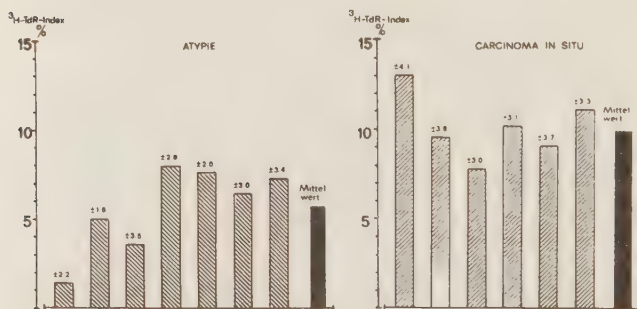


Abb.6: ^3H -TdR-Index (%) in Atypien (schraffierte Säulen; n=7) und Carcinomata in situ (schraffierte Säulen; n=6) mit Angabe des Mittelwertes und der Standardabweichungen

b. Anteil DNS-synthetisierender Zellen nach ^3H -Thymidin-Dauermarkierung:

Nach 49-stündiger, intermittierender Dauermarkierung mit tritiiertem Thymidin wurde in atypischen Urothelbezirken ein Markierungsindex von durchschnittlich 45.3%, bei Extremwerten von 33.0% (± 11.8) und 57.3% (± 12.2) gefunden (Abb. 7). Im Carcinoma in situ wurden ein Mittelwert von 66.2% und Extremwerte von 50.1% (± 12.8) und 81.2% (± 7.9) ermittelt (Abb. 7). Entsprechend der hohen Markierungsunterschiede von Areal zu Areal ergaben sich in den Atypien und Carcinomata in situ jeweils hohe Standardabweichungen. Der Unterschied zwischen der Markierung in beiden Stadien war hochsignifikant ($p < 0.001$; Student-Test).

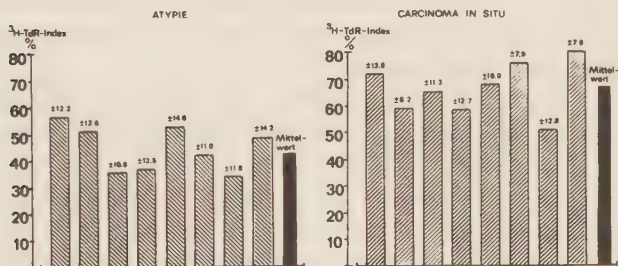


Abb.7: ^3H -Thymidin-Index (%) in atypischen Urothelbezirken (n=8) und Carcinomata in situ (n=8) nach 49-stündiger, intermittierender Dauermarkierung. Angabe der Standardabweichungen und des Mittelwerts

c. Generationszeitzyklus:

Die Kurve der Prozent-markierten Mitosen verlief in den atypischen Urothelbezirken und in den Carcinomata in situ innerhalb von Papillomen nahezu identisch (Abb. 8 und 9). Nach 2 Stunden waren etwa 50%, nach 5 Stunden bereits 90% aller Mitosen markiert. Die maximale Markierung betrug bei den atypischen Herden 97%, bei den Carcinomata in situ 98%. Das hohe Markierungsniveau wird bei beiden Zellpopulationen etwa 4 - 5 Stunden beibehalten, danach nimmt die Anzahl markierter Mitosen wieder ab und erreicht nach der 10. Stunde in den Atypien und der 11. Stunde in den Carcinomata in situ wieder das 50%-Niveau. Nach 14-stündiger radioaktiver Versuchszeit ergibt sich ein Markierungsminimum. Ein leichter Wiederanstieg der Anzahl markierter Mitosen ist nach ca. 17 Stunden erkennbar. Das Markierungsmaximum der zweiten Welle liegt mit 23% für die Atypie und 24% für das Carcinoma in situ jeweils bei ca. 24 Stunden. Nach etwa 30 Stunden radioaktiver Versuchszeit sind nur noch selten markierte Mitosen nachweisbar.

Somit ergibt sich für die Zellen in den atypischen Herden eine durchschnittliche Generationszeit (T_c) von 16 Stunden, beim Carcinoma in situ findet man für T_c einen Zeitraum von 17 Stunden. Die mittlere DNS-Synthesezeit (T_s) liegt bei der Atypie bei 9 Stunden, beim Carcinoma in situ bei 8 Stunden. Die prämitotisch-postsynthetische Phase und die Mitosephase ($T_{G2} + T_M$) zeigen mit 3.5 Stunden für Atypie und 3.0 Stunden für Carcinoma in situ weitgehende Übereinstimmung. Daraus errechnet sich eine mittlere Dauer von 3 bzw. 4 Stunden für die postmitotisch-präsynthetische Phase (T_{G1}) in beiden Stadien. Die Mitosezeit (T_M) schließlich berechnet sich zu ca. 15 Minuten für Carcinoma in situ und 25 Minuten für die Atypie.

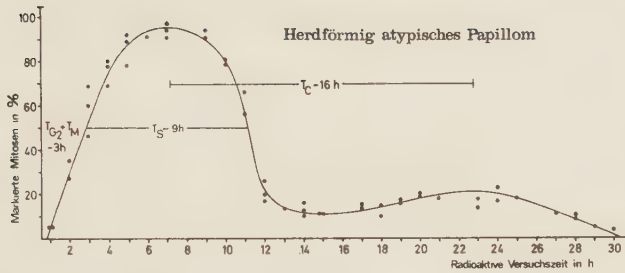


Abb.8: Die Generationszeit und ihre Teilphasen in atypischen Urothelbezirken; ermittelt nach der Prozent-markierten-Mitosen-Methode

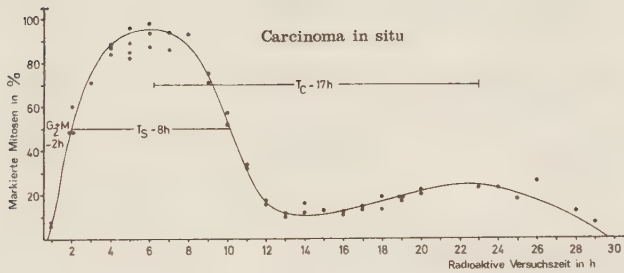


Abb.9: Die Generationszeit und ihre Teilphasen in Carcinomata in situ; ermittelt nach der Prozent-markierten-Mitosen-Methode

Abschließend sollen sämtliche Ergebnisse dieses Kapitels in einer Tabelle zusammengefaßt werden, um einen Überblick zu geben.

Tab. 1

	ATYPIE	CARCINOMA IN SITU
graphische Auswertung		
T_c	17 h	16 h
T_s	9 h	8 h
$G_2 + T_M$	3.5 h	3 h
G_1	4 h	3 h
3H -TdR-Index nach 1 Stunde	5.46 %	10.32 %
3H -TdR-Index nach 49 Stunden	45.3 %	66.2 %
Mitoseindex	0.27 %	0.29 %
rechnerisch ermittelte Werte		
Mitosedauer (T_M)	25 min.	15 min.

IV. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Die vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, daß sich Transformationsstadien in Papillomen während der Entwicklung von Transitionalzellcarcinomen der Rattenharnblase nicht nur durch ihre zytologischen und histologischen Merkmale, sondern auch durch eine unterschiedlich starke Proliferationstendenz unterscheiden.

So ergab sich in atypischen Urothelbezirken nach einer radioaktiven Versuchszeit von 1 Stunde ein durchschnittlicher ^3H -TdR-Index von 5.46%. In Carcinomata in situ war dagegen der Markierungsindex mit 10.32% hochsignifikant um fast das Doppelte höher. Gegenüber dem normalen Urothel von Kontrolltieren, das einen durchschnittlichen ^3H -TdR-Index von 0.26% aufweist (Kunze und Schauer 1971; Kunze, Schauer und Krüsmann 1975), ist der Markierungsindex um das 21-fache in der Atypie, bzw. um das 40-fache im Carcinoma in situ höher. Nach intermittierender Dauermarkierung mit tritiiertem Thymidin für 49 Stunden betrug der Anteil proliferierender Zellen an der Gesamtpopulation in Atypien 45.3%, in Carcinomata in situ 66.2%. Auch dieser Unterschied in der Höhe der Proliferationsaktivität in beiden Transformationsstadien ist hochsignifikant. Das Ausmaß der Proliferationsaktivitätssteigerung in den atypischen Urothelbezirken und Carcinomata in situ ergibt sich aus dem Vergleich mit der normalen Harnblasenschleimhaut, die nach 49-stündiger Dauermarkierung einen durchschnittlichen ^3H -TdR-Index von lediglich 1.22% aufweist (Kunze, Schauer und Krüsmann 1975).

Als Erklärung für die Erhöhung des ^3H -Thymidin-Markie-

rungsindex in den Transformationsstadien kommt in erster Linie eine Vergrößerung des "proliferating pool" oder des "p-compartment" in Frage (vergl. Rajewski 1972; Baserga und Kisielenski 1962; Buchal, Phillips und Trucco 1970; Lennartz 1969), da eine Verkürzung der Generationszeit nicht festgestellt werden konnte. Eine Erhöhung des Anteils DNS-synthetisierender Zellen kann dadurch zustande kommen, daß Zellen aus der G_0 -Phase oder "resting period" (vergl. Epifanova und Terskikh 1969), bzw. aus dem "q-compartment" (Rajewski 1972; Tannock und Burns 1970; Oehlert 1973; Zhinkin 1965) während des Cancerisierungsprozesses in den Generationszeitzyklus eintreten. In diesem Zusammenhang ist bekannt, daß Zellen aus der G_0 -Phase, Zellen also, die vorübergehend aus dem Teilungszyklus ausgeschieden sind, jederzeit nach Einwirken verschiedener Stimuli wiederum in den Generationszyklus und damit in das "p-compartment" überwechseln können.

Die Bestimmung des Generationszeitzyklus mit der Methode von Quastler und Sherman (1959) brachte für die atypischen Urothelbezirke und die Carcinomata in situ einen nahezu identischen Kurvenverlauf des prozentualen Anteils markierter Mitosen. Gleiche Verhältnisse ergaben sich darüberhinaus für das gut differenzierte, invasiv wachsende, solide Transitionalzellcarcinom (Kunze, Schauer und Schatt 1974). Die geringfügigen zeitlichen Differenzen zwischen den einzelnen Zyklusphasen können dabei nicht als signifikant unterschiedlich angesehen werden. Die ermittelten Generationszeiten stellen einen Durchschnittswert für die betreffende Zellpopulation dar; dies schließt nicht aus, daß ein Teil der Zellen oder bestimmte Zellclone einen vom festgestellten Durch-

schnittswert abweichenden Zyklus besitzen. Es kann jedoch angenommen werden, daß die ermittelte Dauer der Zyklusphasen den tatsächlichen Verhältnissen sehr nahe kommt, da die ausgewerteten atypischen Urothelbezirke und die Carcinomata in situ ebenso wie die gut differenzierten Transitionalzellcarcinome lichtoptisch eine weitgehend homogene Zellpopulation aufwiesen, anders als wenig differenzierte, vollausgebildete Tumoren, die in der Regel eine sehr heterogene Zellstruktur aufweisen (Yoshida 1963, zit. bei Lennartz). Die nach der Prozent-markierten-Mitosen-Methode ermittelten Werte für die Generationszeit und ihre Teilphasen haben sowohl für exponentiell wachsende Zellpopulationen als auch für solche im "steady state" Gültigkeit (Leshner, Fry und Kohn 1961).

Bei Betrachtung der Prozent-markierten-Mitosen-Kurve fällt ein relativ niedriger zweiter Markierungsgipfel auf, wobei in Atypien lediglich 23%, in den Carcinomata in situ ca. 24% der Mitosen markiert waren. Für dieses Phänomen kommen verschiedene Erklärungsmöglichkeiten in Betracht:

1. Ein großer Teil der Zellen wandert nach der ersten Teilung aus dem "p-compartment" in das "Q-compartment" ab und scheidet damit für die Länge eines oder mehrerer Generationszeitzyklen aus dem Teilungsgeschehen aus (Mendelsohn, Dohan und Moore 1960; Steel 1972).
2. Die Generationszeit eines Teils der Zellen ist durch eine prolongierte G_1 -Phase so lang, daß eine zweite Teilung innerhalb der angewandten radioaktiven Versuchszeit von 30 Stunden nicht stattfindet (vergl. Sawicki und Rowinski 1970).
3. Eine Anzahl von Zellen geht nach der ersten Teilung

durch Nekrose verloren. Dieser Zellverlustfaktor kann bei vollausgebildeten Tumoren eine große Rolle spielen (Steel 1968; Dustin 1972; Denekamp 1972).

Bagshawe (1968) beschreibt in diesem Zusammenhang einen externen und einen internen Zellverlust: der externe Zellverlust kommt vor allem durch Desquamation von der Tumoroberfläche, der interne durch Nekrosen infolge einer mangelnden Blutversorgung zustande. Dieser Zellverlustfaktor kommt als Erklärung des niedrigen zweiten Markierungsgipfels kaum in Frage, da weder in den atypischen Urothelbezirken noch in den Carcinomata in situ eine größere Anzahl von Nekrosen beobachtet werden konnte. Ein Zellverlust durch Desquamation konnte nur bei solchen Herden stattfinden, die oberflächlich lagen.

4. Als weitere Möglichkeit müssen noch falsch-negative Befunde bei der Auswertung markierter Mitosen in Erwägung gezogen werden. Derartige Fehlerquellen können deshalb eine nicht unerhebliche Rolle spielen, weil durch die Zellteilungen zwangsläufig ein "Verdünnungseffekt" auftritt, der dazu führt, daß die Anzahl von Silberkörnern über einem Zellkern zu gering wird. In einem solchen Fall würde eine gering markierte Mitose als "nicht markiert" gewertet werden (Bryant 1966; Moffat, Youngberg und Metcalf 1971; Dörmer und Brinkmann 1968; Lesh und Oehlert 1970; Helpap und Maurer 1969; Maurer und Primbsch 1964; Peters und Ashley 1967; Walker und Kember 1972).

Interessant wäre nun der Vergleich zwischen dem Generationszeitzyklus der Transformationsstadien bzw. des vollentwickelten Transitionalzellcarcinoms und Papillomen ohne Atypie bzw. der normalen Harnblasenschleimhaut. Untersuchungen über den Generationszeitzyklus in Papil-

lomen und im normalen Urothel gibt es jedoch nicht. Das hängt damit zusammen, daß die Bestimmung des Zellzyklus nach der "Prozent-markierten-Mitosen-Methode" an diesen Zellpopulationen sehr zeitaufwendig und praktisch nicht durchführbar ist, da das normale Urothel und Papillome eine sehr geringe mitotische Aktivität aufweisen. Die Anwendung des Doppelmarkierungsverfahrens mit ^3H - und ^{14}C -Thymidin würde lediglich zur Ermittlung der DNS-Synthesezeit führen. Die rechnerische Bestimmung der Generationszeit auf der Basis des ^3H -TdR-Index bzw. des Mitose-Index und der DNS-Synthesezeit (Leblond et al. 1955; Regele und Lunglmayer 1969; Schreiber et al. 1969) ist problematisch, da die Voraussetzung zur Anwendung dieses Verfahrens die Teilnahme aller Zellen an der Proliferation ist. Im Falle der normalen Harnblasenschleimhaut ist diese Voraussetzung mit Sicherheit nicht erfüllt, da sich ein großer Teil der Urothelzellen im "q-compartment" oder in der G_0 -Phase befindet.

Somit muß die Frage offen bleiben, ob es in den Transformationsstadien zu einer Generationszeitverkürzung im Vergleich zum Ausgangsgewebe kommt, wie es auf Grund der Erkenntnisse bei anderen Cancerisierungsmodellen zu erwarten wäre (Literaturübersicht bei Bresciani 1968). Einen Vergleich der Proliferationsaktivität verschiedener Tumoren im Verhältnis zu ihren Ausgangsgeweben findet man bei Tubiana (1971). Dörmer und Mitarbeiter (1964) konnten beispielsweise an der cancerisierten Haut der Maus eine sukzessive Verkürzung der Generationszeit in aufeinanderfolgenden Entwicklungsstadien feststellen, wobei an der unveränderten Haut eine Generationszeit von 150 Stunden, an Hyperplasien von 56 Stunden und an invasiv wachsenden Plattenepithelcarcinomen von 32 Stunden ermittelt wurde. Reiskin und Mendelsohn (1964) stellten

bei der Cancerisierung der Backentasche des Hamsters eine Generationszeit von 142 Stunden für die Basalzellen fest, während sich in Hyperplasien eine Generationszeitdauer von 42 Stunden und in Carcinomen von 20.7 Stunden ergab. Bresciani (1968) ermittelte an den Drüsenstrukturen der normalen Brustdrüse der Maus eine Generationszeit von 64 Stunden; sie verkürzte sich in hyperplastischen Knoten auf 41 Stunden und im vollentwickelten Carcinom auf 33 Stunden. Die Verkürzung der Generationszeit ging nach den Untersuchungen von Bresciani auf eine Verkürzung aller Teilphasen zurück. Häufig kommt es nur zu einer wesentlichen Verkürzung der G_1 -Phase (Baserga 1965; Lennartz 1969). Eine Verkürzung der Generationszeit ist allerdings nicht obligat für die Cancerogenese, wie lange Zeit angenommen wurde (Literaturübersicht bei Baserga 1965), da auch eine Verlängerung der Zellzyklusdauer beobachtet werden konnte. So fanden Post und Mitarbeiter (Post, Huary und Hoffmann 1963; Post und Hoffmann 1964) in 3-Methyl-4-Dimethylaminoazobenzol-induzierten Hepatomen mit 31 Stunden eine deutlich längere Generationszeit als im normalen Leberparenchym junger Ratten, das eine Generationszeit von 21.5 Stunden aufwies.

An der Harnblase sind weitere detaillierte, vergleichende proliferationskinetische Untersuchungen, insbesondere am normalen Urothel, notwendig, um eine Aussage über mögliche Änderungen des Wachstumsverhaltens während des Cancerisierungsprozesses machen zu können. Derartige Untersuchungen erscheinen nicht nur für die Grundlagenforschung interessant, sondern können möglicherweise auch für eine cytostatische Therapie von Bedeutung sein.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden autoradiographische Untersuchungen über das Proliferationsverhalten von atypischen Urothelbezirken und Carcinomata in situ innerhalb experimentell induzierter Papillome der Harnblase während der malignen Entartung durchgeführt. Insgesamt wurde dazu 140 weiblichen Wistar-Ratten N-Butyl-N-(4-Hydroxybutyl)-Nitrosamin in einer Dosierung von 20 mg/kg Körpergewicht täglich im Trinkwasser verabreicht. Die Expositionszeit betrug 80 Tage, die Gesamtversuchsdauer 250 Tage. In Atypien ergab sich nach einer radioaktiven Versuchszeit von 1 Stunde ein mittlerer ^3H -Thymin-Markierungsindex von 5.5%, in Carcinomata in situ lag er bei 10.3%. Nach 49-stündiger, intermittierender Dauermarkierung mit tritiiertem Thymin wurde ein durchschnittlicher ^3H -Thymin-Markierungsindex von 45.3% in atypischen Urothelbezirken und von 66.2% in Carcinomata in situ ermittelt. Die Unterschiede in der Höhe der Markierungintensität in Atypien und Carcinomata in situ sind hoch signifikant und werden auf eine Vergrößerung des sogenannten proliferating pool zurückgeführt. Die Bestimmung des Generationszeitzyklus nach der Prozentmarkierten-Mitosen-Methode ergab eine nahezu gleichlange Dauer der einzelnen Teilphasen in Atypien und Carcinomata in situ. Die mittlere Dauer des gesamten Zyklus wurde für beide Zellpopulationen mit 16 bis 17 Stunden ermittelt. Die durchschnittliche Länge der DNS-Synthesephase betrug 8 bzw. 9 Stunden, die prämitotisch-postsynthetische Phase ($G_2 + M$ -Phase) be-

lief sich auf 3 Stunden. Daraus errechnete sich für die Dauer der G₁-Phase ein Wert von 3 bzw. 4 Stunden. Die an der Harnblase gewonnenen Ergebnisse wurden mit bisher bekannten Daten von anderen Cancerisierungsmodellen verglichen und diskutiert.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

BAGSHAW, K.: Tumor growth and anti-mitotic action
Brit. Journ. of Cancer 22, (1968)

BASERGA, R.: The relationship of the cell to tumor
growth and control of cell division: A review
Cancer research 25, 581 (1965)

BASERGA, R. and W. KISIELENSKI: Comparative study of
cellular proliferation of normal and tumorous tissues
with the use of tritiated thymidine. I. Dilution of the
label and migration of labelled cells
Journ. of the Nat. Canc. Inst. 28, 331 (1962)

BRESCIANI, F.: Cell proliferation in cancer
European J. Cancer 4, 343 (1968)

BRYANT, B.: The incorporation of tritium from thymidine
into proteins of the mouse
J. cell. biol. 29, (1966)

BUCHAL, R., D. PHILLIPS and E. TRUCCO: Area relations
between labelling index curves from multicompartment
cell kinetics models
Cell Tissue Kinet. 3, 67 (1970)

CHRISTELLER, E.: Pathologie und pathologische Anatomie
der Geschwülste der Harnblase
Zschr. Urol. 19, 103 (1925)

DENEKAMP, J.: The relationship between the cell loss factor and the immediate response to radiation in animal tumours

Europ. J. Cancer 8, 335 (1972)

DÖRMER, P. und W. BRINKMANN: Anwendung der Autoradiographie in der klinischen Forschung

Verh. d. Ges. für Histochemie auf dem Ao. Symposium in Hamburg vom 26.-28. Sept. 1968

DÖRMER, P., H. TULINIUS und W. OEHLERT: Untersuchungen über die Generationszeit, DNS-Synthesezeit und Mitosezeit von Zellen der hyperplastischen Epidermis und des Plattenepithelcarcinoms der Maus nach Methylcholanthrenpinselung

Z. Krebsforschung 66, 11 (1964)

DUSTIN, P.: Cell differentiation and carcinogenesis: a critical review

Cell Tissue Kinet. 5, 519 (1972)

EPIFANOVA, O. and V. TERSKIKH: On the resting periods in the cell life cycle

Cell Tissue Kinet. 2, 75 (1969)

HARTMANN, N. and T. PEDERSEN: Analysis of the kinetics of granulosa cell populations in the mouse ovary

Cell Tissue Kinet. 4, 433 (1971)

HELPAP, B. und W. MAURER: Autoradiographische Untersuchungen zur Frage der Vergleichbarkeit des Einbaus von markiertem Thymidin unter in vivo Bedingungen bei Inkubation von Gewebeproben

Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 4, 102 (1969)

KUNZE, E. und A. SCHAUER: Enzymhistochemische und autoradiographische Untersuchungen an Dibutylnitrosamin-induzierten Harnblasenpapillomen der Ratte

Z. Krebsforsch. 75, 146 (1971)

KUNZE, E. und A. SCHAUER: Morphology of butylbutanolnitrosamine induced urinary bladder tumours and their precedent stages

9th International Congress of the International Academy of Pathology, Helsinki 1972

KUNZE, E., A. SCHAUER und S. SCHATT: Morphologie und Proliferationskinetik der Entwicklungsstadien von Harnblasentumoren der Ratte

Verh. Dtsch. Ges. Path. 58, 508 (1974)

KUNZE, E., A. SCHAUER und G. KRÜSMANN: Focal loss of alkaline phosphatase and increase of proliferation in preneoplastic areas of the rat urothelium after administration of N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine and N-(4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazol formamide

Z. Krebsforsch. 1975 (im Druck)

LEBLOND, C., M. VULPE and F. BERTALANFFY: Mitotic activity of epithelium of urinary bladder in albino rat

J. Urol. 73, 311 (1955)

LENNARTZ, K.: Proliferationskinetik von Tumorzellen

Fortschritte der Krebsforsch., Molekularbiologie Wachstum; Klinik Hrsg. C.G. Schmidt

Schattauer-Verlag, Stuttgart - New York (1969)

LESH, R. and W. OEHLERT: Autoradiography

Beitr. Path. Bd. 141, 293 (1970)

LESHER, S., R. FRY and H. KOHN: Age and the generation time of the mouse duodenal epithelial cell

Exper. Cell Research 24, 334 (1961)

MAURER, W. und E. PRIMBSCH: Größe der β -Selbstabsorption bei der Autoradiographie

Exper. Cell Research 33, 8 (1964)

MELICOW, M.: Tumours of the urinary bladder: a clinico-pathological analysis of over 2500 specimens and biopsies

J. Urol. 74, 498 (1952)

MENDELSON, M., F. DOHAN and H. MOORE: Autoradiographic analysis of cell proliferation in spontaneous breast cancer of C_3H mouse. I. Typical cell cycle and timing of DNA synthesis

Journ. of the Nat. Cancer Inst. 25, 477 (1960)

MENDELSON, M.: The growth kinetics of solid tumours

Cell Tissue Kinet. 3, 405 (1970)

MOFFAT, D., S. YOUNGBERG and W. METCALF: The validity of autoradiographic labeling

Cell Tissue Kinet. 4, 293 (1971)

OEHLERT, W.: Cellular proliferation in carcinogenesis

Cell Tissue Kinet. 6, 325 (1973)

PETERS, T. and C. ASHLEY: An artefact in radioautography due to binding of free amino acids to tissues by fixatives

Journ. of Cell Biology 33, 10 (1967)

POST, J. and J. HOFFMANN: The replication time and pattern of carcinogen-induced hepatoma cells

Journ. of Cell Biology 22, 341 (1964)

QUASTLER, H. and F. SHERMAN: Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse

Exp. Cell Research 17, 420 (1959)

RAJEWSKI, M.: Proliferative parameters of mammalian cell systems and their role in tumour growth and carcinogenesis

Z. Krebsforsch. 78, 12 (1972)

REGELE, H. und G. LUNGLMAYR: Zur Wachstumsdynamik des Übergangsepithels

Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 2, 229 (1969)

REISKIN, A. and M. MENDELSON: A comparison of the cell cycle in induced carcinomas and their normal counterpart

Canc. Research 24, 1131 (1964)

SAWICKI, W. and J. ROWINSKI: Proliferation kinetics in epithelium of Guinea-Pig colon

Cell Tissue Kinet. 3, 375 (1970)

SCHAUER, A., E. KUNZE und S. SCHATT: Stages in the development of urinary bladder tumours induced by butylbutanolnitrosamine

2nd International Symposium on Cancer Detection and Prevention, Bologna 1973

SCHREIBER, H., W. OEHLERT und K. KUGLER: Regeneration und Proliferationskinetik des normalen und strahlengeschädigten Urothels der Ratte

Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 4, 30 (1969)

STEEL, G.: Cell loss from experimental tumours

Cell Tissue Kinet. 1, 193 (1968)

STEEL, G.: The cell cycle in tumours: an examination
of data gained by the technique of labelled mitoses

Cell Tissue Kinet. 5, 87 (1972)

STENIUS, F.: Studien über Pathologie und Klinik der
Papillome und Carcinome der Harnblase

zitiert nach Hückel (1934)

TANNOCK, J. and F. BURNS: On the existence of a G_0 -phase
in the cell cycle

Cell Tissue Kinet. 3, 321 (1970)

TUBIANA, M.: The kinetics of tumour cell proliferation
and radiotherapy: A review article

British Journ. of Radiology 4, 325 (1971)

WALKER, K. and K. KEMBER: Cell kinetics of growth carti-
lage in the rat tibia

Cell Tissue Kinet. 5, 401 (1972)

ZHINKIN, L.: DNA synthesis and kinetics of cell popula-
tions in development

Cell Differentiation and Induction Mechanisms

(Ed. by G. Lopashov, A. Meyfakh and O. Stroeve) 233, (1965)

ZUCKERKANDL, O.: Blasengeschwülste

Wien. med. Wschr. 60, 441 (1910)

Herrn Professor Dr. Schauer danke ich für die Überlassung des Themas und für die guten Arbeitsmöglichkeiten in seinem Labor.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Dr. Kunze, der mir bei allen Problemen mit Rat und Tat zur Seite stand. Die Zusammenarbeit mit ihm war für mich in wissenschaftlicher und menschlicher Hinsicht ein Gewinn.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei Frau Polt bedanken, ohne deren freundliche Unterstützung ein so reibungsloses Zustandekommen der Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

LEBENS LAUF

Am 25. Oktober 1950 wurde ich, Norbert Fischer, als ältestes Kind des Zimmermeisters Ernst Fischer und seiner Ehefrau Anneliese Fischer, geb. Trautmann, in Ulm/Donau geboren.

1957 - 1961 Besuch der Volksschule in Ulm-Söflingen

1961 Eintritt in das Schubart-Gymnasium in Ulm, wo ich den neusprachlichen Zug besuchte

1969 im Juni Absolvierung der Reifeprüfung

Anschließend bewarb ich mich um einen Studienplatz im Fach Humanmedizin, der mir zum WS 69/70 an der UNI München zugeteilt wurde. An dieser Universität absolvierte ich mein gesamtes vorklinisches und klinisches Studium.

1970 im September Ablegung des Vorphysikums

Nach Abschluß des 3. Studiensemesters wurde meinem Antrag auf ein Doppelstudium der Fächer Medizin-Psychologie von beiden Dekanaten stattgegeben.

1972 im April Absolvierung des Physikums

1973 im August Diplom-Vorprüfung in Psychologie bestanden

Vom April 1973 an bis Oktober 1974 war ich im Pathologischen Institut der Universität München mit meiner Doktorarbeit beschäftigt.

1975 im Juni Absolvierung des medizinischen Staatsexamens

